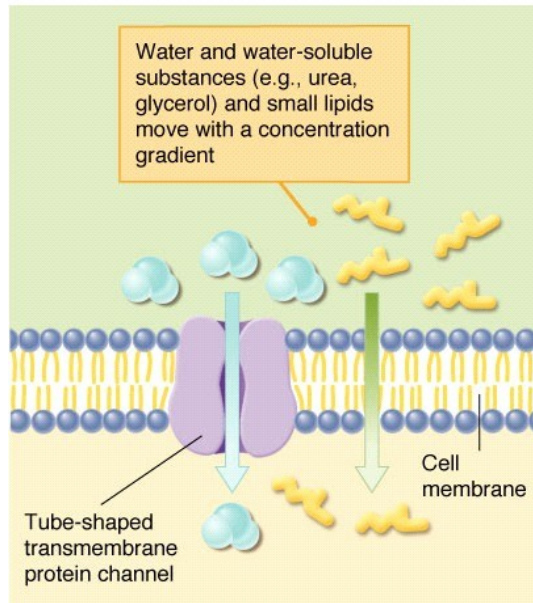


„ABC“ o ABC transportérech

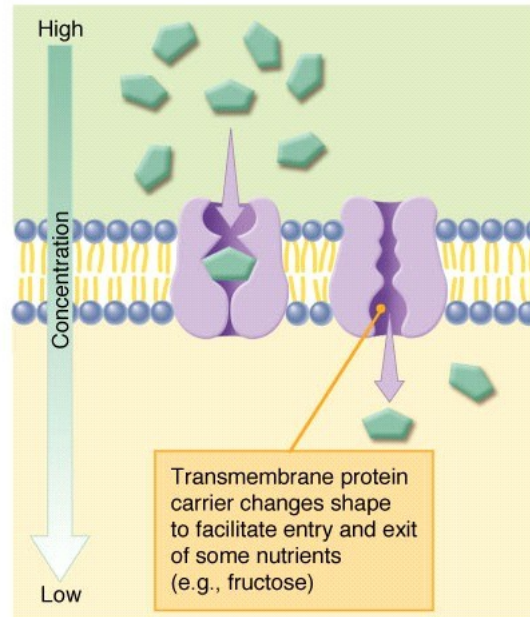
- Aktivní a pasivní transport živin
- ABC transportéry – historie, filogeneze, struktura, evoluce, SNP
- Fyziologická role
- Kmenové buňky
- Nádorové bujení
- Multiléková rezistence
- Neurodegenerativní choroby
- Detekce ABC transportérů
- Aktuální projekty



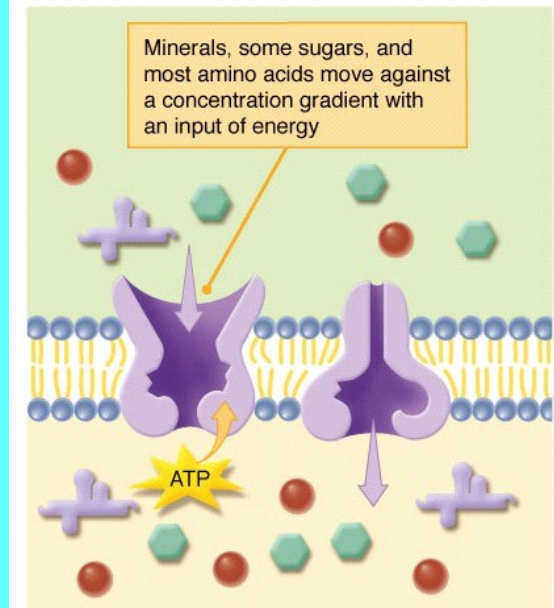
PASSIVE DIFFUSION



FACILITATED DIFFUSION

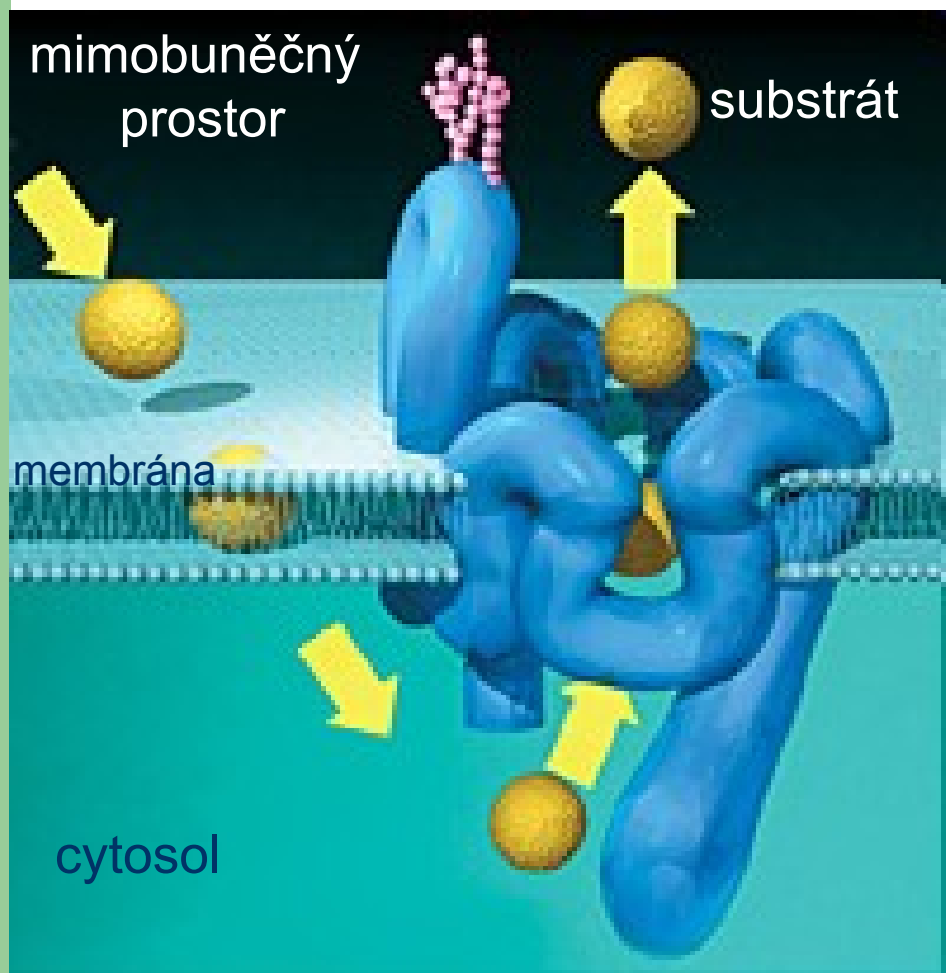


ACTIVE TRANSPORT



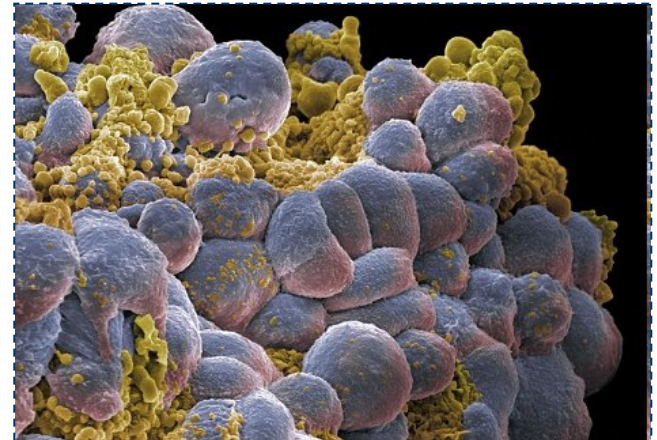
ABC transportéry

http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch1_mdr.jpg



- **A**TP-**b**inding **c**assette
= NBD doména
- Za spotřeby **A**TP pumpují toxické látky/metabolické produkty **V**EN z buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám

- 50. léta – jak jednobuněčný plankton přežije ve slané vodě?
- 60. léta – iontové pumpy závislé na ATP
- 70. léta – transportéry větších molekul závislé na ATP
- 80. léta – nadměrná exprese ABC transportérů způsobuje rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapii
- Až dosud – hledání látek, které inhibují funkci nebo expresi ABC transportérů

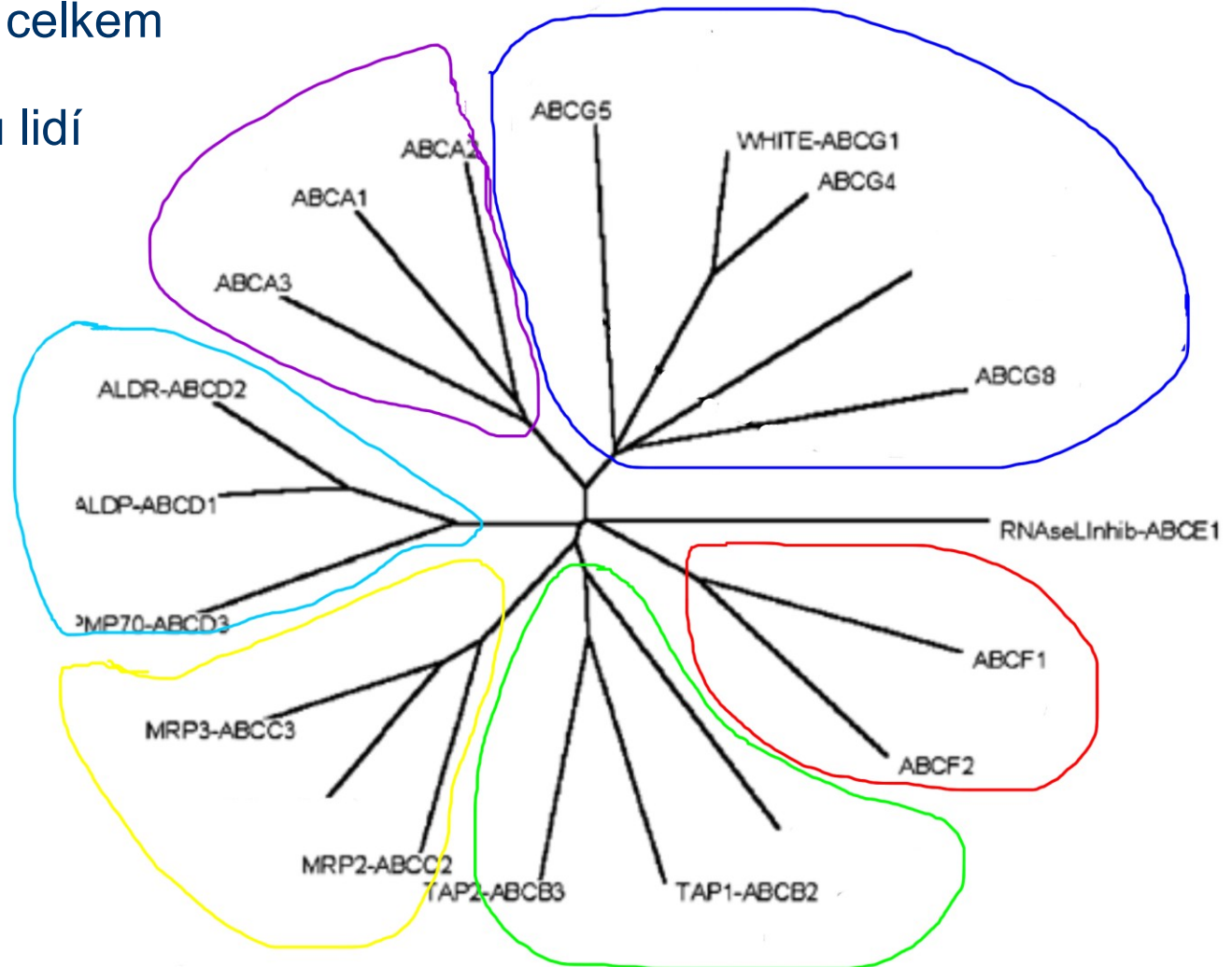


Filogenetický strom ABC transportérů

http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig_tab/1206938f1.html#figure-title

100 proteinů celkem

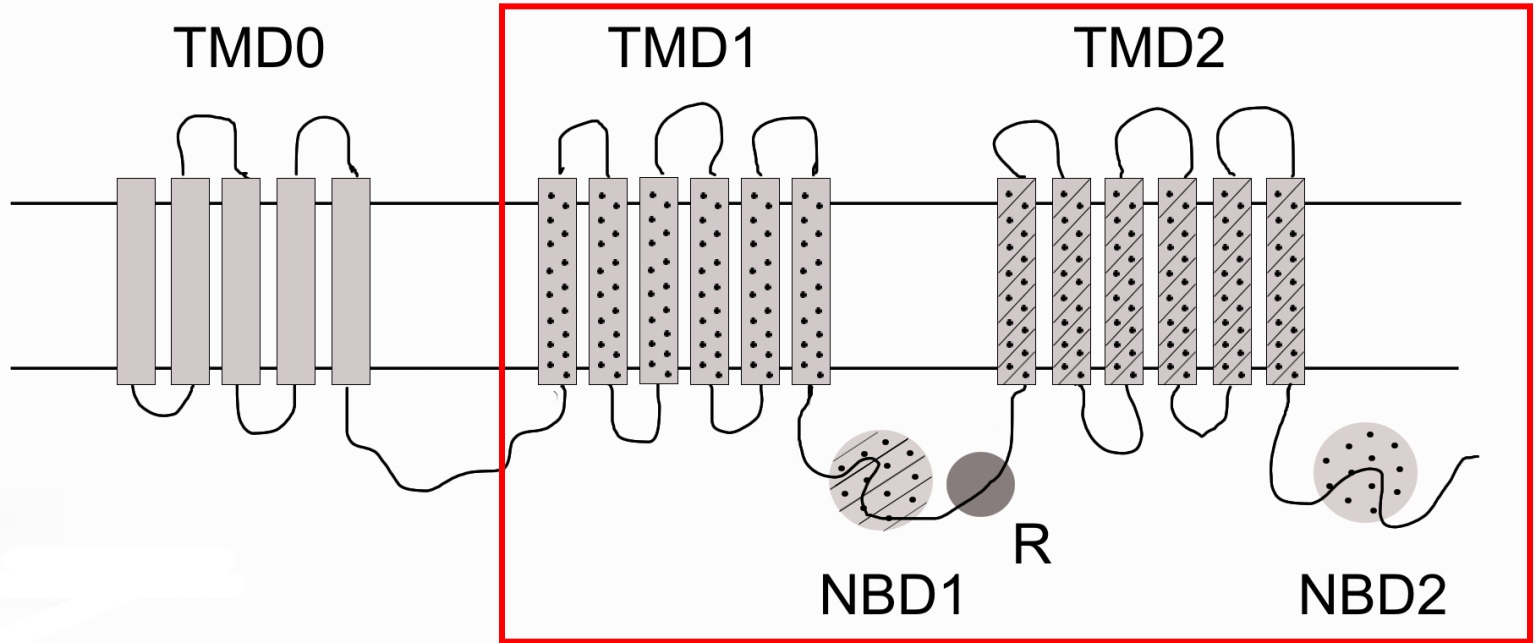
48 proteinů u lidí







7 rodin (A-G) podle sekvenční homologie

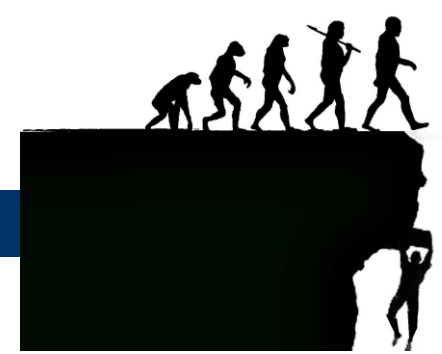
Struktura

NBD ... nucleotid (ATP)-vázající doména
TMD ... transmembránová doména
R ... regulační doména



-  ABC C1-3, 6
-  ABC A1, B1, B5, ABC C4, 5, 7
-  ABC G2
-  Regulační doména of ABC A1, C7

Full transportéry
Half transportéry



- Nekovalentně spojený transmembránový protein a ATPáza (bakterie)
- Nejprve vznikly half transportéry
- Full transportéry vznikly jejich duplikací později

ABC B5

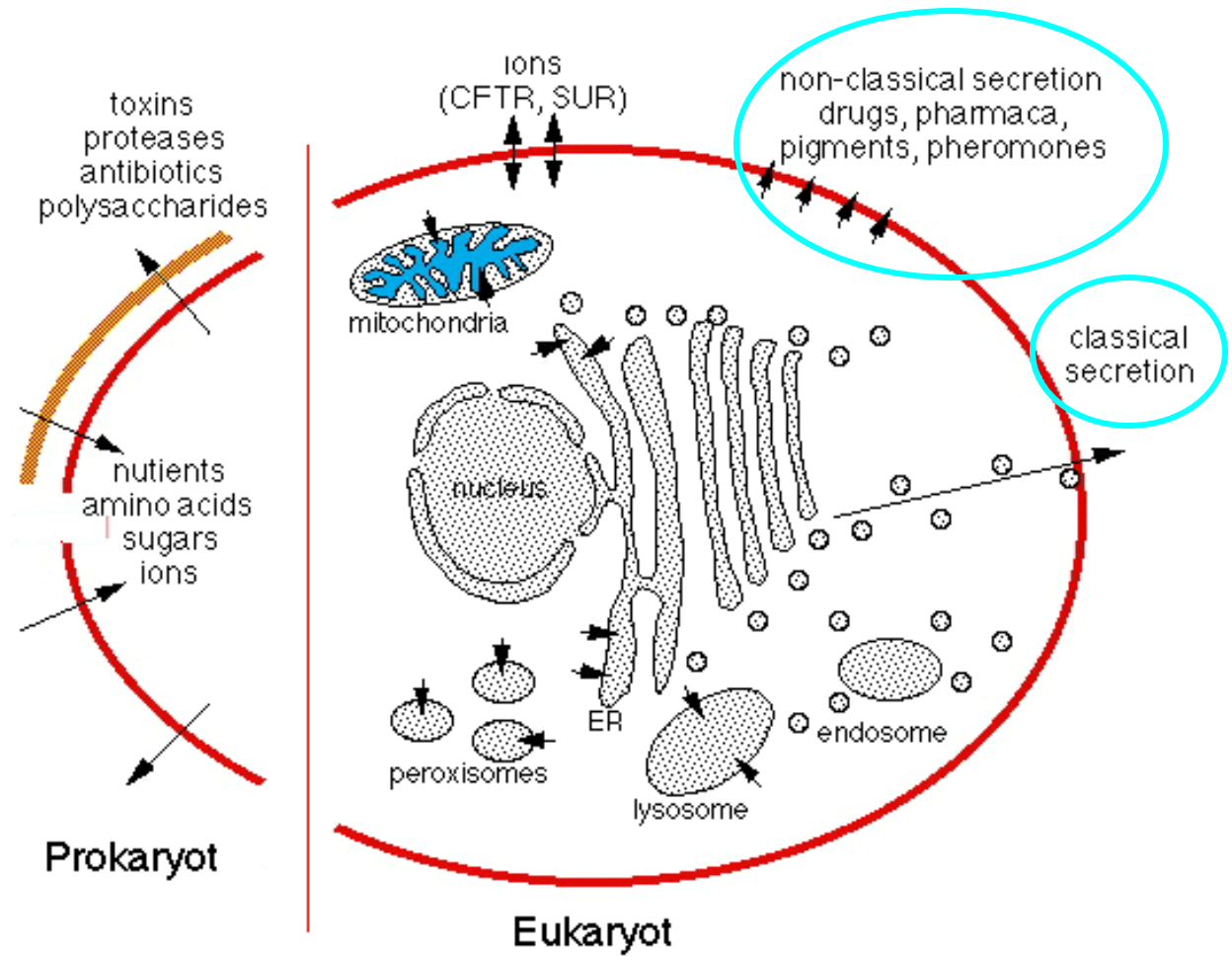
- Více sestřihových variant – dlouhá a krátká forma
- Krátká forma vznikla delecí části TMD z dlouhé formy
- Z původního half transportéru vznikla dlouhá forma a z ní krátká forma

ABC G2 vs ABC B1

- ABC B1: N konec – TMD1 – NBD1 – TMD2 – NBD2 – C konec
- ABC G2: N konec – NBD – TMD – C konec
 - TMD ABC G2 podobnější kvasinkovým ABC transportérům
 - **Spojovací oblast** je velmi homologická

Výskyt ABC transportérů

<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2000/buxton/a>



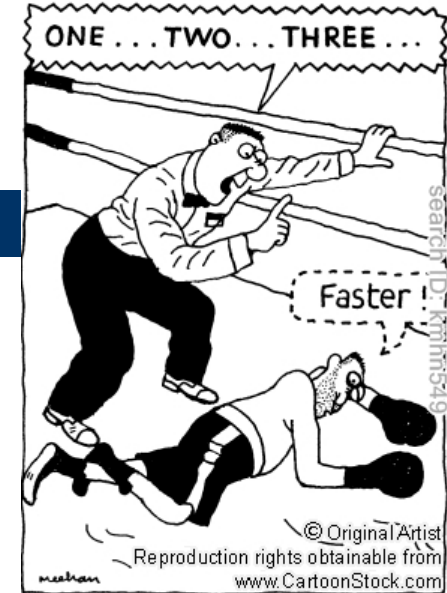
Šipky označují výskyt a směr transportu

- Polymorfismus (SNP) – mutace, kterou nese více než 1 % populace
- ABC transportéry jsou velmi polymorfické
- Např. ABC B1 – více než 50 SNP, často synonymní, často více SNP ve vazbě
- ! i synonymní SNP může změnit afinitu substrátu!
- Zkoumá se, zda právě SNP mohou ovlivnit výsledek léčby
- Jediná pozitivní korelace –
nádor ovária ABC B1 G2677T/A
– nižší pravděpodobnost relapsu



Knock-outs

- Delece obou alel genu u myši
- Testováno 32 z 48 savčích ABC
- Jen 5 z nich je embryonálně nebo postnatálně letálních
 - ABC B7 – kolaps respiračních procesů
 - ABC E5 – selhání recyklace ribosomů
 - ABC A3 – respirační selhání (nedostatek surfaktantu)
 - ABC A12 – defekty plic a kůže
 - ABC C9 – srdeční selhání
- Jsou evolučně konzervované, ale flexibilní, a tak se mohou vzájemně zastoupit a také exportovat nové člověkem vyrobené látky



Fyziologická role ABC transportérů

Substráty



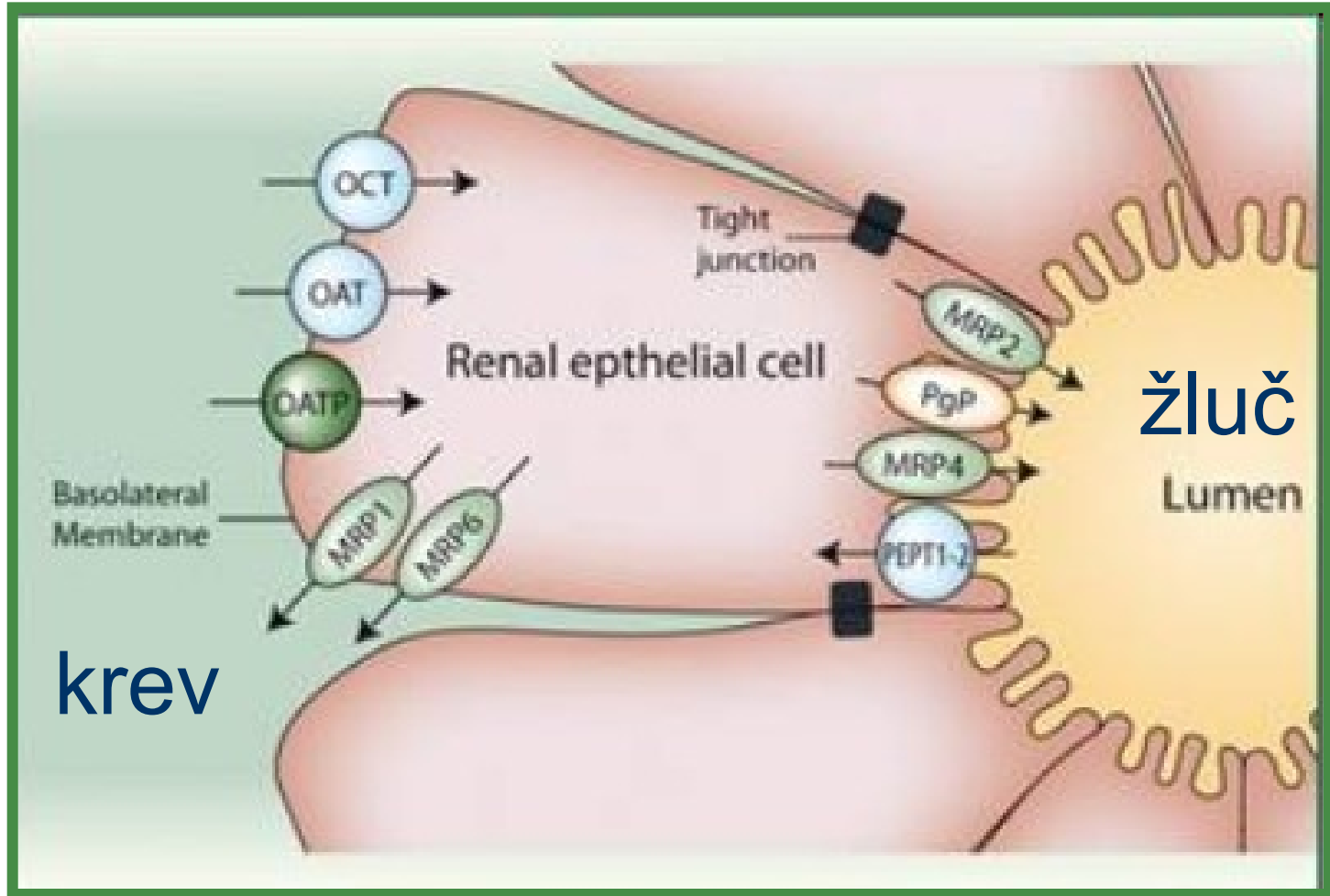
Kanál	Fyziologické substráty
MDR1	Konjugáty estrogenu, endorfin, glutamát, beta-amyloid, steroidy, PAF
MRP1	Konjugáty glutationu a glukuronidu s leukotrienem C4, bilirubinem, žlučovými solemi
BCRP	Vitamíny (riboflavin, biotin), porfyriny, konjugáty estrogenu

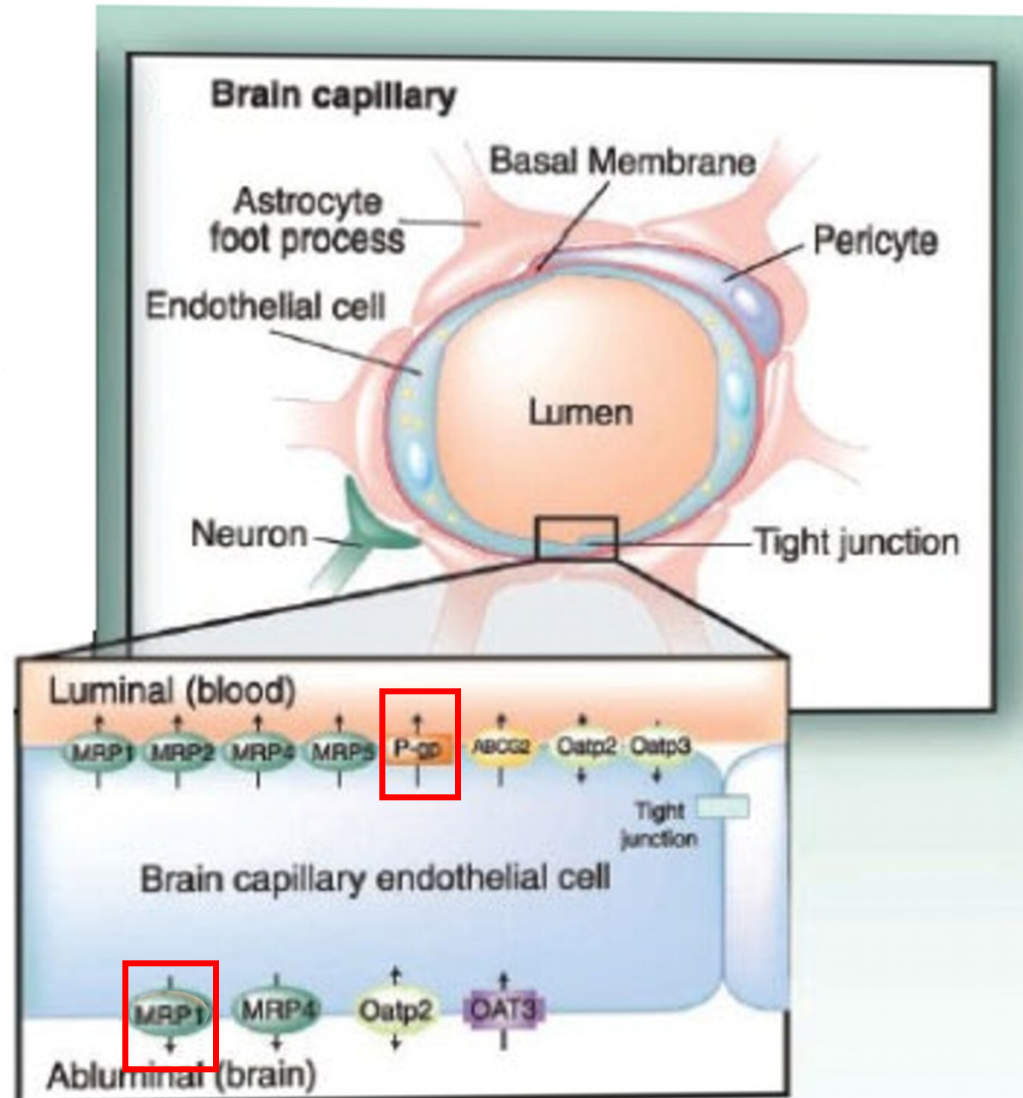
Substráty ABC transportérů - výživa



<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2000/buxton/a>

Živina	Membránový Transportér	Efekty
Flavonoidy (quercetin) jejich glukosidy a glukuronidy – ovoce, zelenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) ➤ Multidrug Resistant Protein 2 (MRP 2) ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Substrát
Extrakty z hořkého melounu (1-monopalmitin), grapefruitu (bergamottin and quercetin), sóji	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Inhibice
Extrakt z hroznových jader	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Inhibice
Steroly (e.g. Cholesterol)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ABCA1, ABCG1, ABCG5 and ABCG8 	Substrát
Sezamové semínko (Isophosphatidylcholine, linoleoyl)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Některé transportéry ve střevu 	Inhibice
Mono-, di-, and triglutamáty folátů	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) 	Substrát
Rostlinné výtažky Curcumin, ginsenosidy, piperin, katechiny ze zeleného čaje, silymarin, hyperforin z kávy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Substrát/inhibitor







Expresse je vysoká v „bariérových“ tkáních, v epitelech vystavených vnějšímu prostředí, v tkáních které redistribuují metabolity

!Specifická apikální/bazolaterální lokalizace !

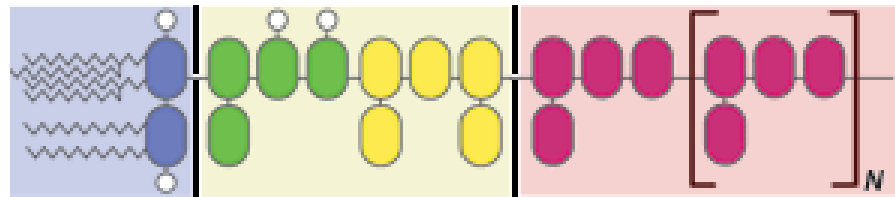
Tissue	Apical (luminal) side of membrane						Basolateral (abluminal) side of membrane			
	ABC B1	ABC C2	ABC C4	ABC C5	ABC C7	ABC G2	ABC C1	ABC C3	ABC C4	ABC C6
Blood-brain barrier	Urquhart 2009	Bauer 2008	Zhang 2004	Zhang 2004	N.A.	Urquhart 2009	Gazzin 2011	N.D.	Zhang 2004	Zhang 2000
Endothelia	Lechapt 1997	N.D.	Tagami 2009	Weksler 2005	Tousson 1998	Higashikuni 2010 Asashima 2006	N.A.	Eilers 2008 Warren 2009	Tagami 2009	Beck 2003
Lung	Wioland 2000 Lechapt 1997	Sandusky 2002	N.D.	N.A.	Wioland 2000 Lechapt 1997	N.D.	Wioland 2000 Lechapt 1997	N.D.	N.D.	Beck 2003
Liver	Mahmood 2001	Scheffer 2002 Wetering 2007	N.D.	N.A.	Kimman 2000	Maliepaard 2001 Jonker 2000	Mayer 1995	Scheffer 2002 Wetering 2007	Rius 2003 Denk 2004	Beck 2003 Madon 2000
Kidney	Schinkel 2003	Harris 2006 Aubel 2002	Aubel 2002	N.A.	Morales 2000	Huls 2007	Peng, 1999	Scheffer 2002	N.D.	Beck 2003 Scheffer 2002
Choroid plexus	Rao 1999	Soontornmalai 2005	N.D.	N.D.	Hincke 1995	Cooray, 2002	Rao 1999	Soontornmalai 2005	Reichel 2010	Zhang 2000
Intestine	Thorn, 2005	Zimmermann 2005 Gutmann 2005	Li 2007	Zimmerman 2005	Li 2007	Zimmermann 2005 Gutmann 2005	Zimmermann 2005	Zimmermann 2005	Li 2007	Beck 2003
Syncytiotrophoblast	Atkinson 2003 Jonker 2000 Nagashige 2003	St-Pierre 2000	N.D.	Pascolo 2003 Meyer 2005	Faller 1995 Damiano 2011	Atkinson 2003 Jonker 2000 Nagashige 2003	Atkinson 2003 Jonker 2000 Pascolo 2003	N.D.	Aleksunes 2008	N.D.
Testis	Robillard 2012 Bart 2004	Bart 2004	Robillard 2012	Augustine 2005	Boockfor 1997	Bart 2004	Robillard 2012 Bart 2004	N.D.	Robillard 2012	N.D.

N.A. not analyzed

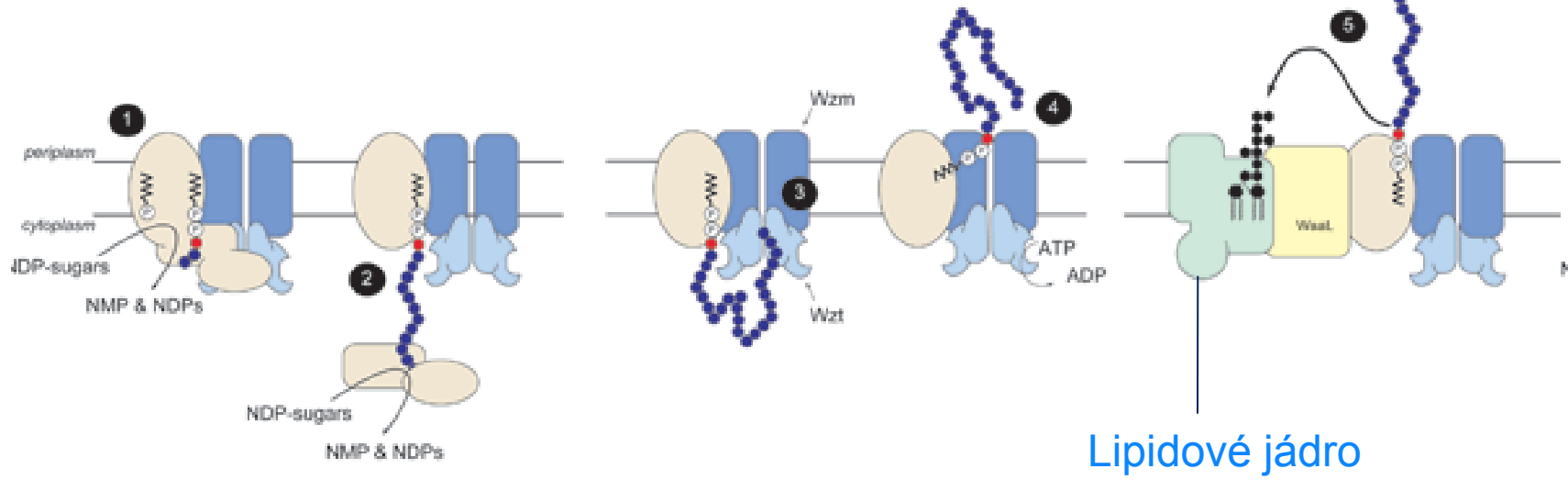
N.D. not detected

http://www.uoguelph.ca/~cwhitfie/images/abc_transporter.gif

Lipid fukóza N-acetyl
glukosamin galaktóza



Polysacharid

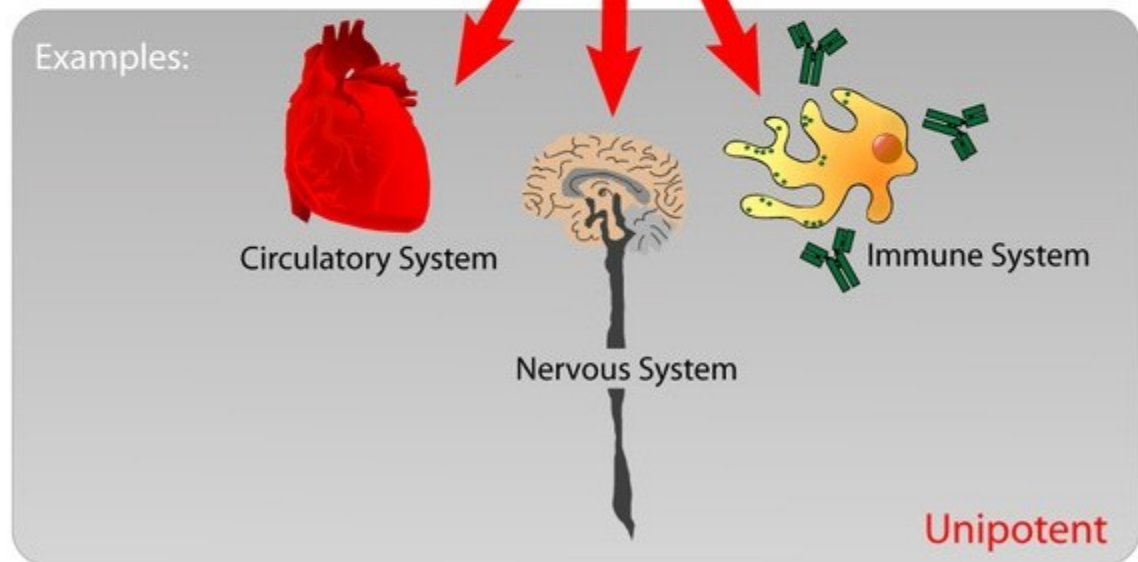
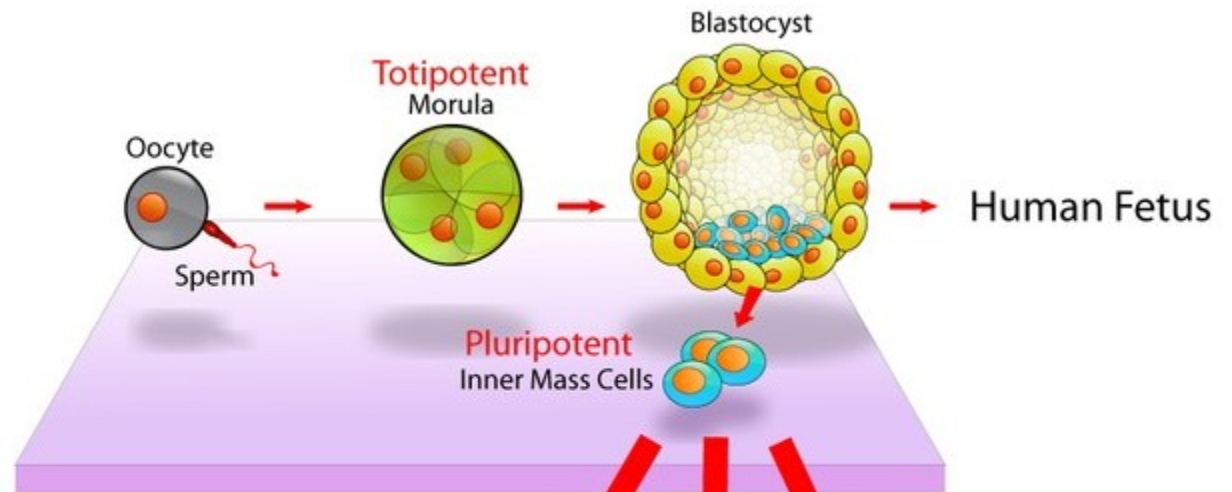


Lipidové jádro

Kmenové buňky

http://community.livinglakecountry.com/blogs/eagles_eye/Stem%20cells%20diagram%5B1%5D.jpg

V průběhu
diferenciace
klesá
exprese
ABC
transportérů



Výjimka: zvyšování
exprese v bariérových
a metabolických
tkáních

„Dye exclusion assays“

MDR1 - JC1, rhodamin 123 x Cyclosporin D, reversin

MRP1 - Calcein AM x MK571, NSAID

BCRP - Hoechst 33342 x fumitremorgin C

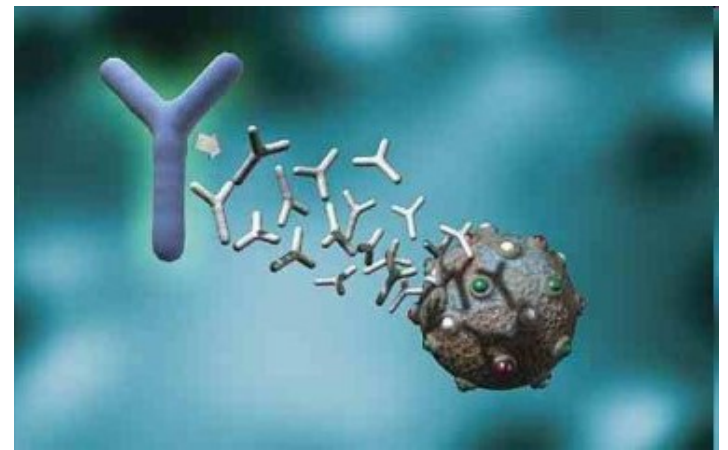
- Bodipy-prazosin

- Pheophorbid A

Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

Imunodetekce

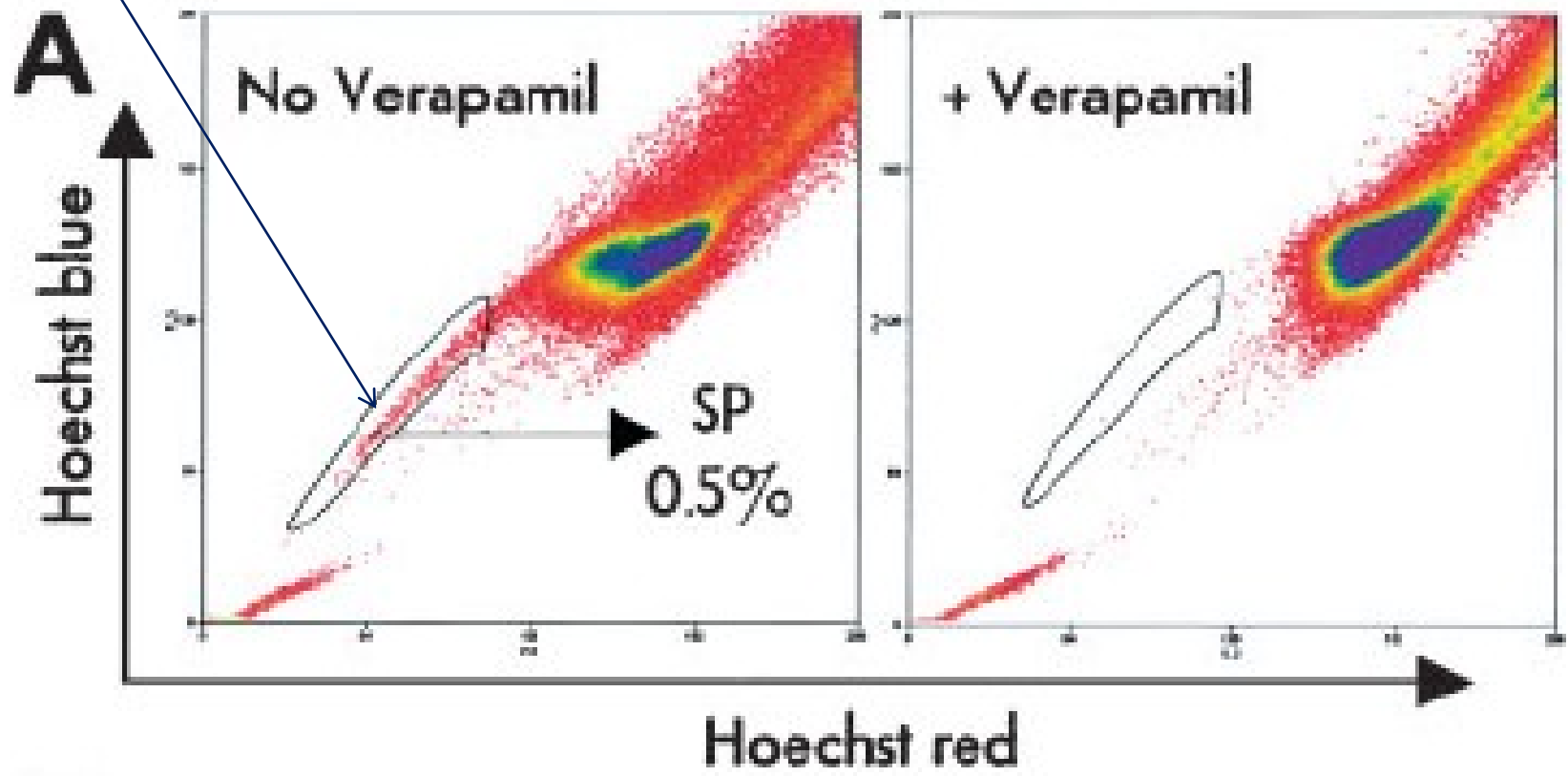
qRT-PCR



„SP“ buňky

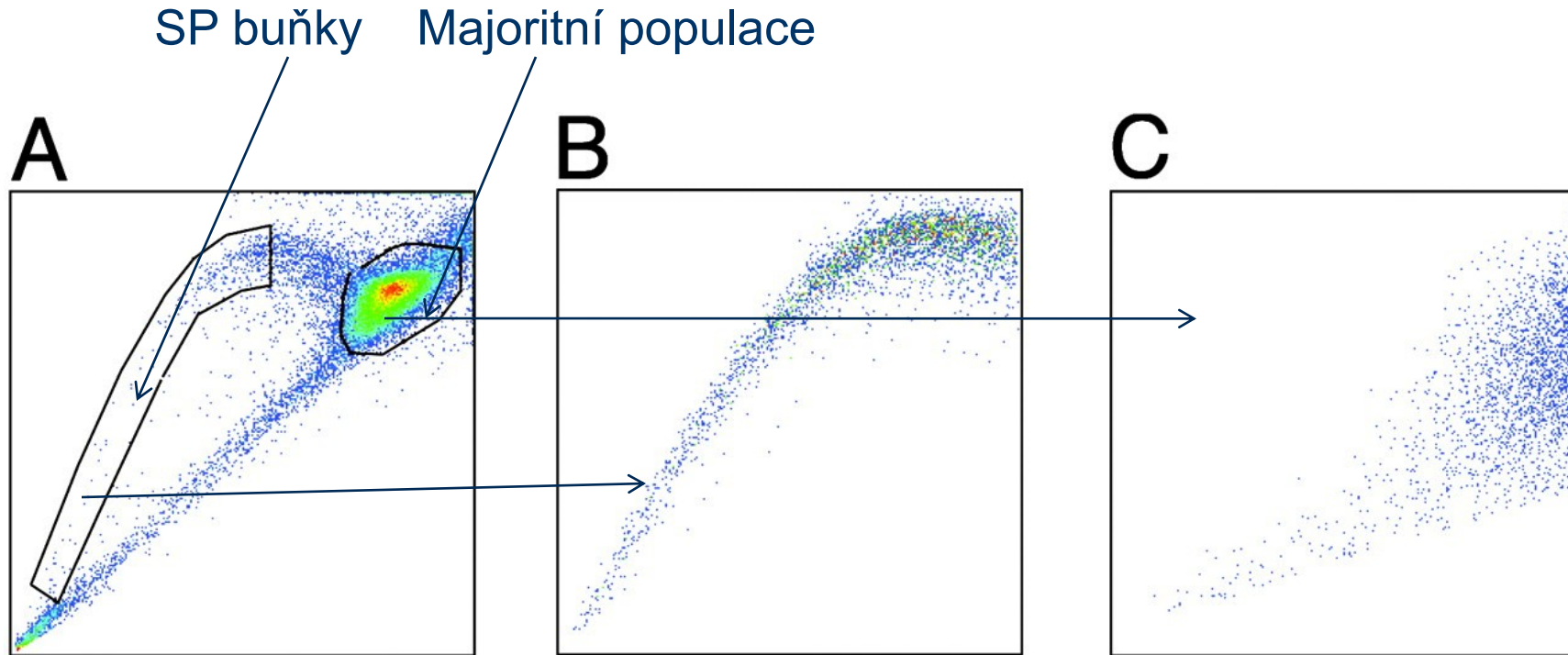
Hoechst 33342 - substrát BCRP, MDR1
- inhibitor verapamil

<http://www.bu.edu/cms/www.bumc.bu.edu/leukemia-lymphoma-laboratory/files/Images/sidepop.jpg>



Buňky C2C12 - myoblasty

Hirschmann-Jax, C. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14228-14233



A: V linii se vyskytují SP buňky a majoritní populace

B: SP buňky z neuroblastomové buněčné linie produkují SP a ne-SP

C: Buňky majoritní populace zůstávají jen majoritními

Patologický výskyt

16 ABC genů bylo asociováno s dědičnými poruchami

Tangierova choroba (*ABC A1*) – poruchy sekrece cholesterolu a fosfolipidů (nadměrná hladina v buňkách, narušena homeostáza)

Dubin Johnson syndrom (*ABC C2*) – neschopnost jater sekretovat konjugovaný bilirubin do žluče

Pseudoxanthoma elasticum (*ABC C6*) – mineralizace a fragmentace elastinových vláken, problém s vitamínem K

Cystická fibróza (*ABC C7*) – poruchy sekrece působků pankreatu a dalších exokrinních žláz

Asociace ABC transportérů a chorob CNS

CNS disease	ABC transporters examined in the context of this disease	References
Ischemic stroke	ABCB1,ABCCI	Spudich and others 2006; Kilic and others 2008; ElAli and Hermann 2010c
Epilepsy	ABCB1, various ABCCs, ABCG2	Seegers and others 2002; Löscher and Potschka 2005
Brain cancer	ABCB1,ABCCI,ABCG2	Porro and others 2010
Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, multiple systems atrophy	ABCB1	Bartels and others 2008; Westerlund and others 2008
Alzheimer disease	ABCA1,ABCA2,ABCB1, ABCG2	Riddell and others 2007; Mace and others 2005; Lam and others 2001; Kuhnke and others 2007; Cotte and others 2009
Adrenoleukodystrophy	ABCD1	Mosser and others 1993
Multiple sclerosis	ABCB1,ABCG2	Kooij and others 2010; Xiong and others 2009
Brain metabolic disorders	ABCA1,ABCA2,ABCC8 (SUR1),ABCC9 (SUR2), ABCG1,ABCG4	Kaminski and others 2006; Bojanic and others 2010; Kim and others 2008; Sakai and others 2007

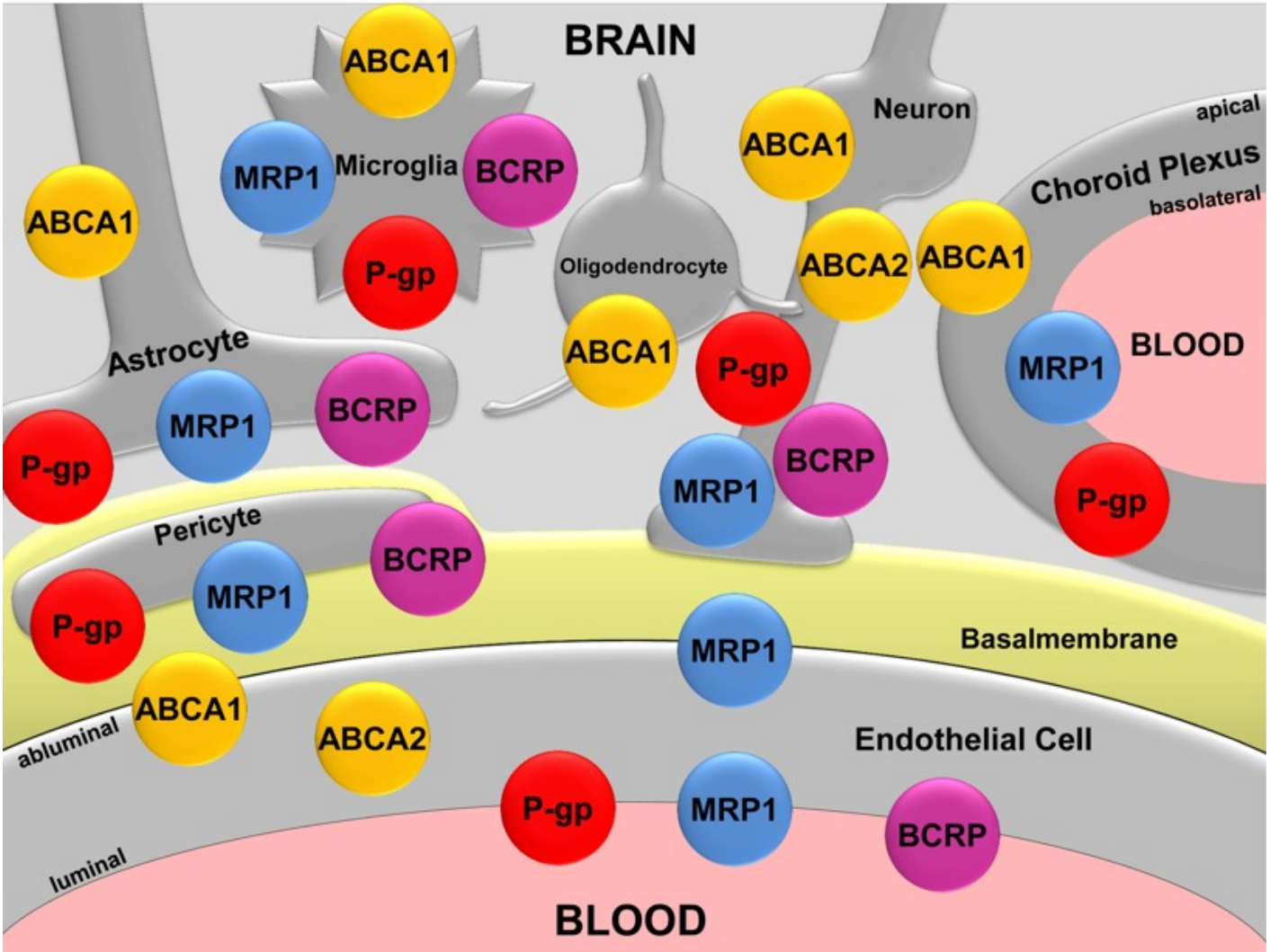
ATP-Binding Cassette Transporters and Their Roles in Protecting the Brain

Ayman ElAli and Dirk M. Hermann

Neuroscientist 2011 17: 423 originally published online 25 April 2011

V mozku je HODNĚ ABC

Wolf et al. 2012. Frontiers in psychiatry.3(54): 1-14

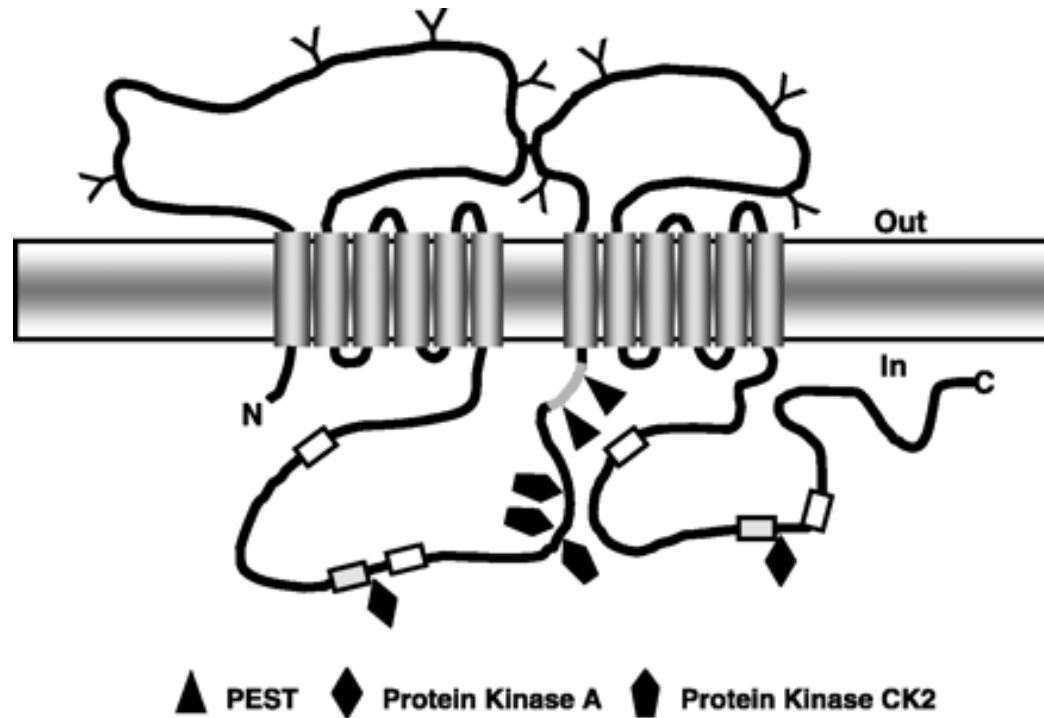




- Amyloid precursor protein (APP) – Amyloid β 40, 42
- AD pacienti – 100x zvýšená hladina $A\beta$ plaků
- ABC A1 v CNS – substrát cholesterol a fosfolipididy (ne $A\beta$) eflux z neuronů, astrocytů, microglií – lipidace ApoE
- ABC A1 malfunkce – špatně lipidované ApoE částice – přímá interakce s $A\beta$ – agregace a tvoření plaků
- ABC A1 – exprese zvýšená pomocí LXR aktivátorů – zvýšená sekrece $A\beta$ 40, 42
- myši – zvýšená exprese ABC A1 po LXR – zlepšení paměti
x
- AD pacienti – zvýšená hladina ABC A1 mRNA a proteinu (+ ApoE) – SNPs(?) 8 z 14 studií ukazuje spojení mezi polymorfismem a zvýšeným rizikem vzniku AD

Regulace funkce ABC A1

Oram, Heinecke Physiol Rev October 1, 2005 vol. 85 no. 4 1343-137



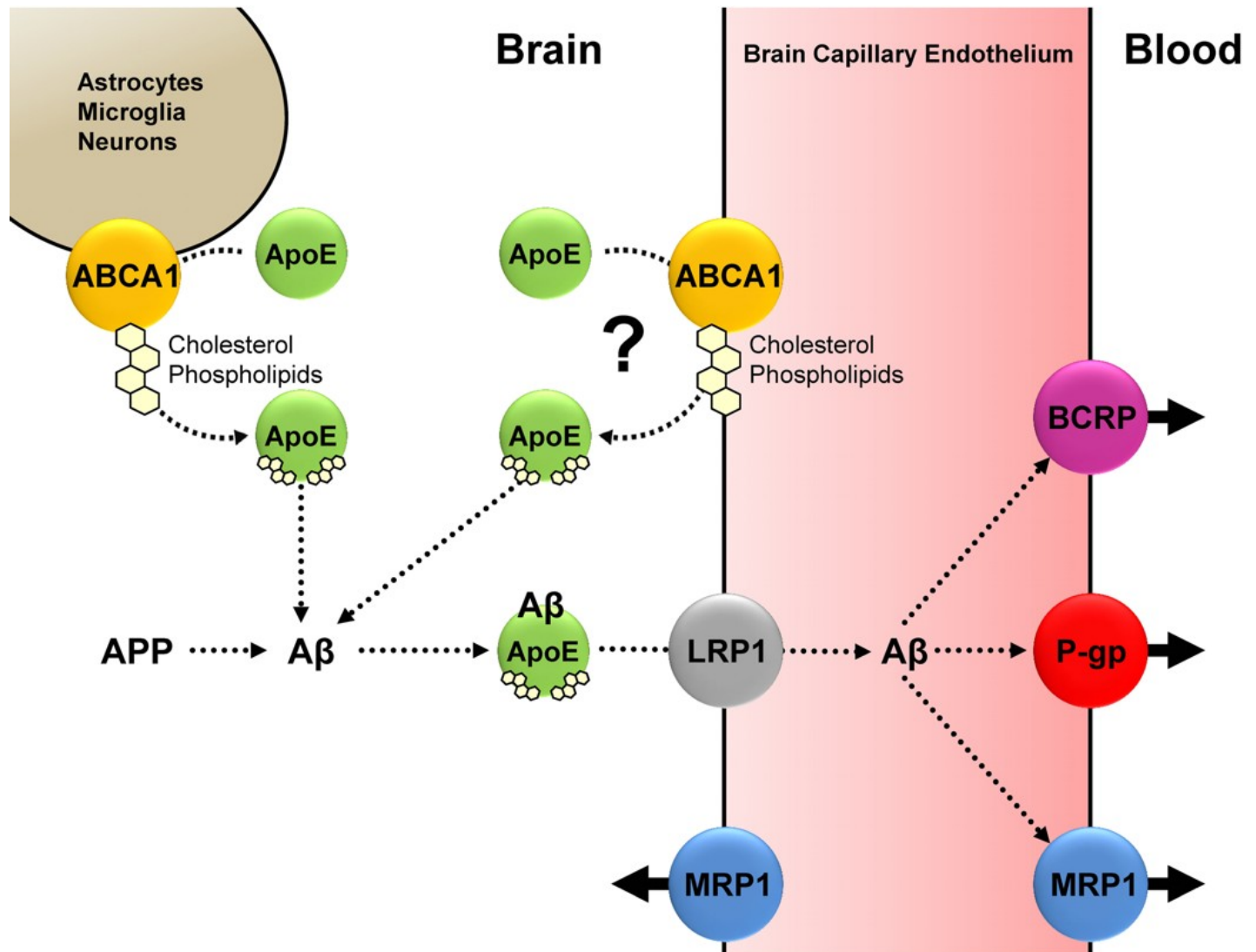
Fosforylace oblasti:
PEST – degradace
PKA – optimální funkce
PKCK2 – oslabení funkce



- ABC B1 exportuje $A\beta$ (luminální část kapiláry)
- ABC B1a,b -/- myši – snížené odstraňování $A\beta$ z mozku
- Dysfunkční ABC B1 na BBB – akumulace $A\beta$
- AD pacienti – snížená hladina ABC B1 v cévách kolem $A\beta$ plaků
- Asociace mezi SNPs a rizikem vzniku AD nebyla nalezena
- ABC B1 exprese je zvýšena aktivací PXR – pomalejší pokles ztráty mozkových funkcí (klinická studie)
- $A\beta$ může regulovat (snižovat) expresi ABC B1

Odstraňování A β

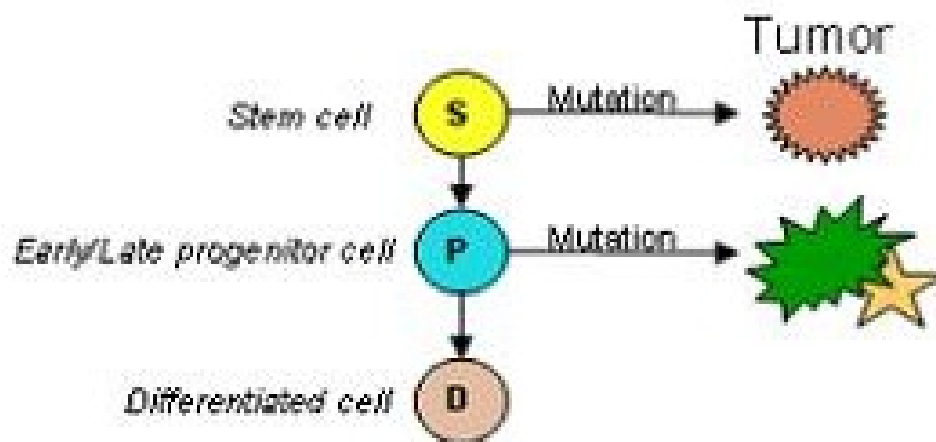
Wolf et al. 2012. Frontiers in psychiatry.3(54): 1-14



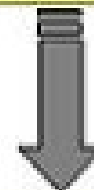
- Selhání chemoterapie (nádorové b. jsou obvykle citlivější než „zdravé“ buňky)
- *De novo*/získaný fenotyp MDR (cytotoxic *in vitro* **MTT**-assay)
- Mechanizmy:
 - Změny v metabolických drahách, které se podílejí na detoxifikaci látek
 - Změny v reakci organismu na poškození DNA
 - Změny v aktivitě topoizomerázy II
 - Změny v drahách regulujících apoptózu
 - **Zvýšená produkce ABC transportérů**
- Nádorová b. se vymyká vlivu svého prostředí (obsahujícího chemoterapeutikum), získává růstovou výhodu

Nádorová kmenová buňka

<http://www.gnf.org/assets/001/23050.jpg>

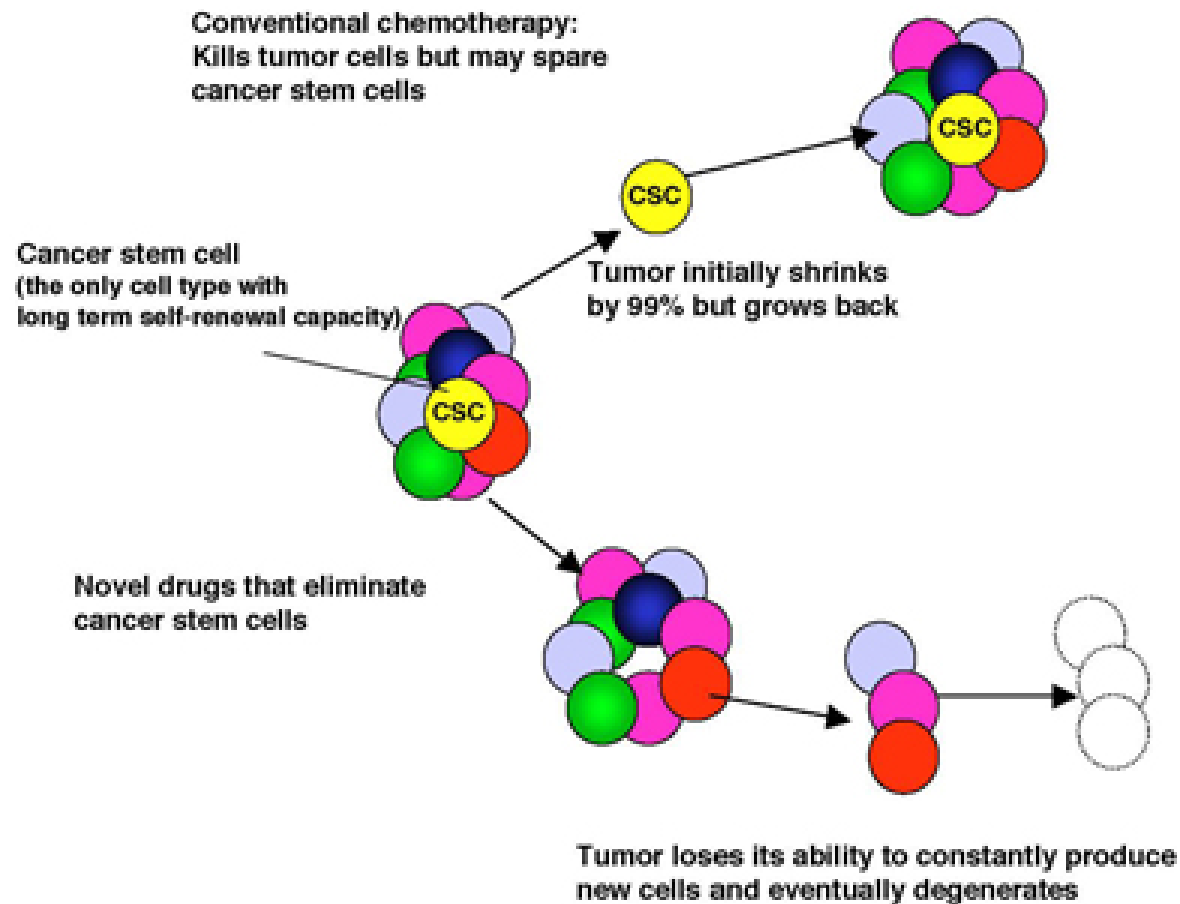


Tumors from Stem cells
Heterogenous cancer
Increased metastatic potential



Tumors from late progenitor cell
Homogenous cancer
Less metastatic potential

Strategie léčby



<i>Protein</i>	<i>Substráty – chemoterapeutika</i>
<i>ABCB1/MDR1</i>	<i>colchicine, doxorubicin, etoposid, adriamycin, vinblastine, digoxin</i>
<i>ABCC1/MRP1</i>	<i>doxorubicin, daunorubicin, etoposid, colchicines, etoposide, rhodamine</i>
<i>ABCG2/BCRP</i>	<i>Mitoxantrone, topotecan, CPT-11, rhodamine</i>

! Jeden transportér má různé substráty -> **MULTI**léková rezistence !

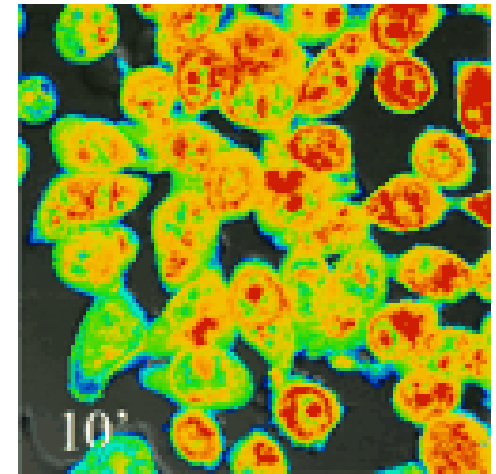
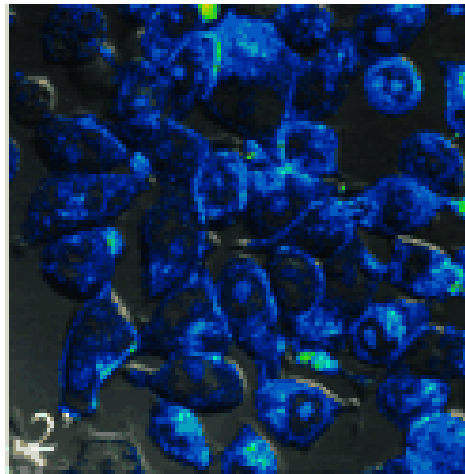
Zkřížená rezistence

Rezistence buněk S1-M1-80 získána kultivací s Doxorubicinem (substrát MDR1 a BCRP)

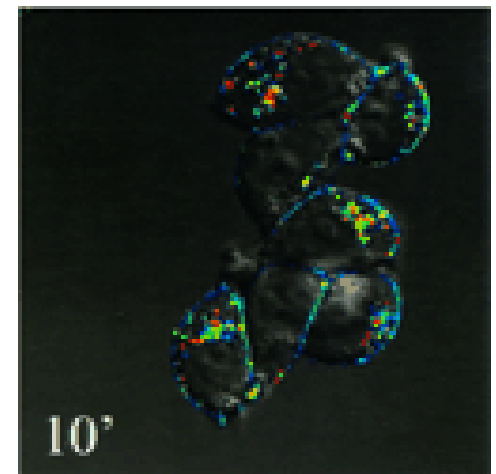
Dean et al.: the role of the abc transporters drug resistance and pharmacology

Mitoxantron - fluoreskující substrát BCRP a MDR1

S1 wt



S1-M1-80



Pgp substráty ve vstupní terapii:

Podle: The Medical Letter

Lung: SCLC: C + G or C + Taxol or C + Vinorelbine

NSCLC: Taxol + P

Breast: Adriamycin + C Taxol or C + Adriamycin + F or CMF

Prostate: GnRH analogue

Colorectal: 5-Fu + L

Pancreas: G

Ovarian: C + Taxol

Uterus: M or Adriamycin + P ± C

Lymphoma: HD: Adriamycin + B + Vinblastine + D or M + Vincristine + PP/ABV

NHL: C + Adriamycin + Vincristine + P or C + Vincristine + P

High grade: C + Adriamycin + Vincristine + P + M

Leukemia: ALL: Vincristine + P + L-asparaginase + Adriamycin / Daunomycin

AML: Ara-C + Daunomycin / Idarubicin

CLL: C + Vincristine + P or Fludarabine

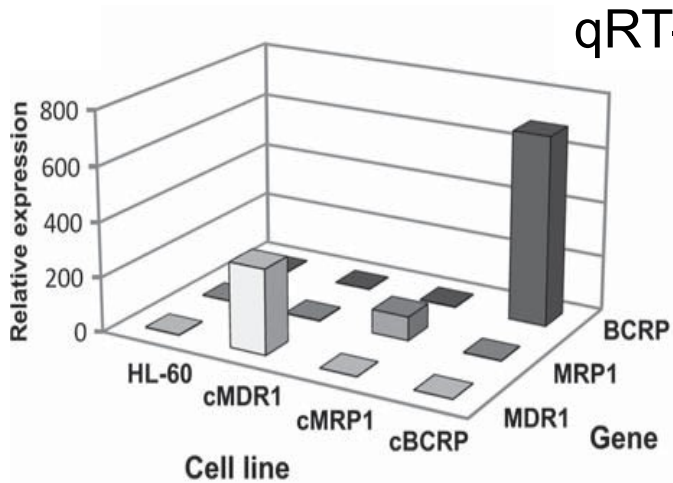
CML: Gleevec

Bladder: M + Vinblastine + Adriamycin + C

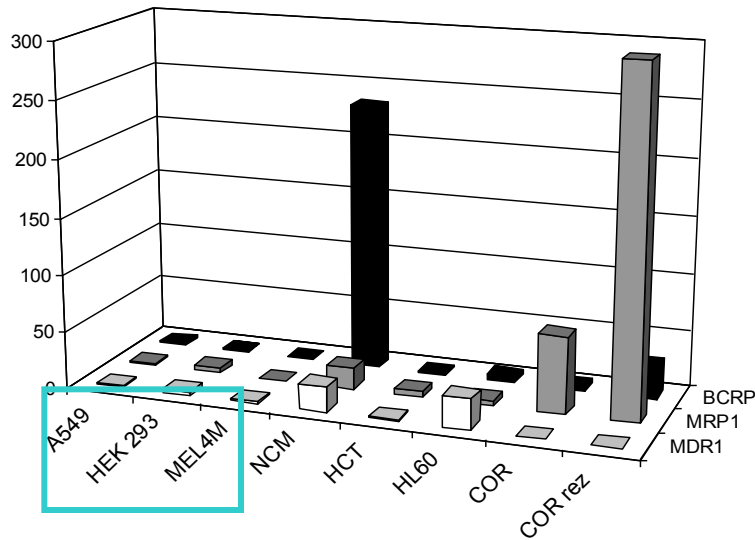
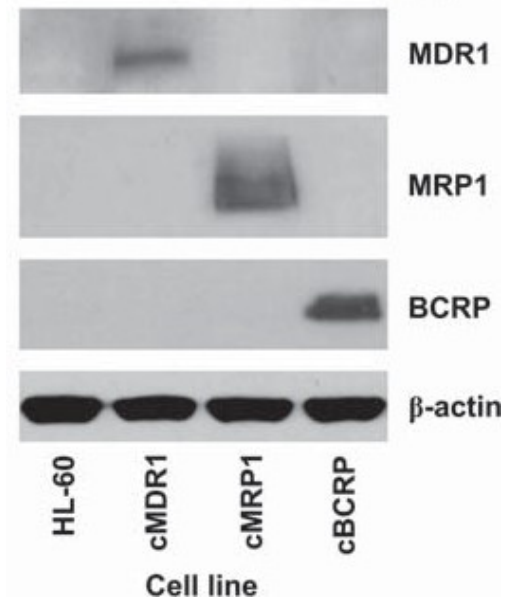
Myeloma: Vincristine + Adriamycin + D or MP

Aktuální projekty

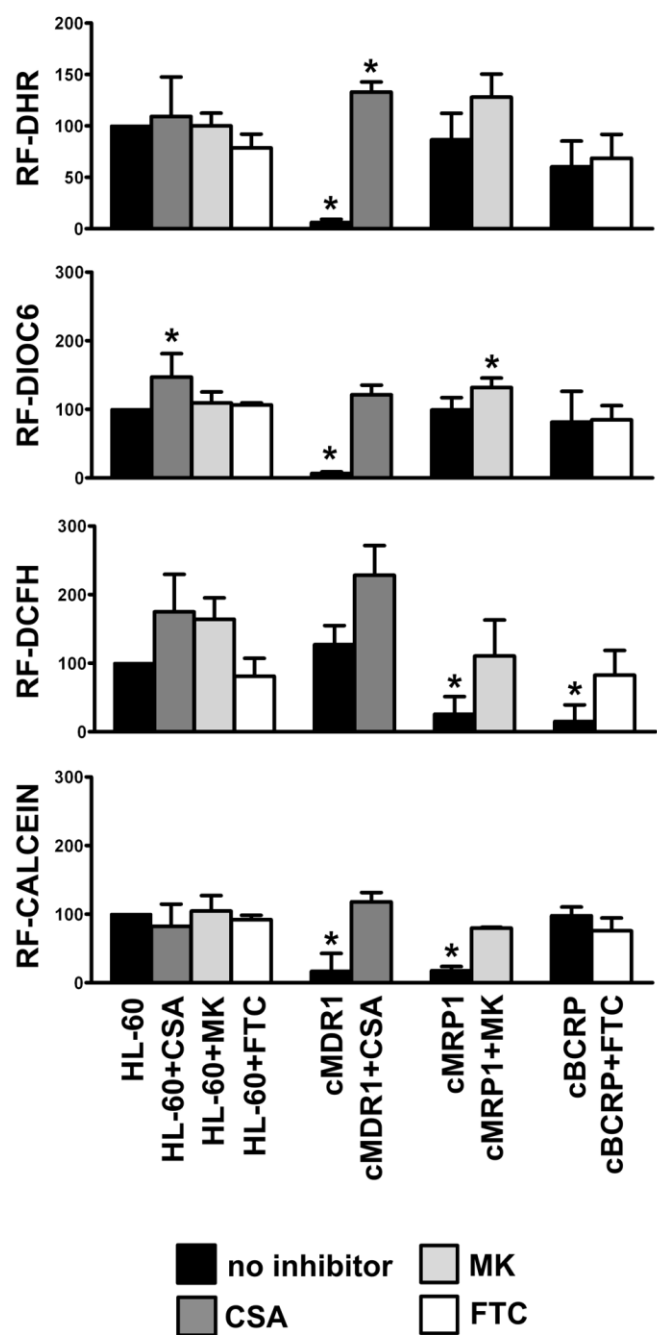
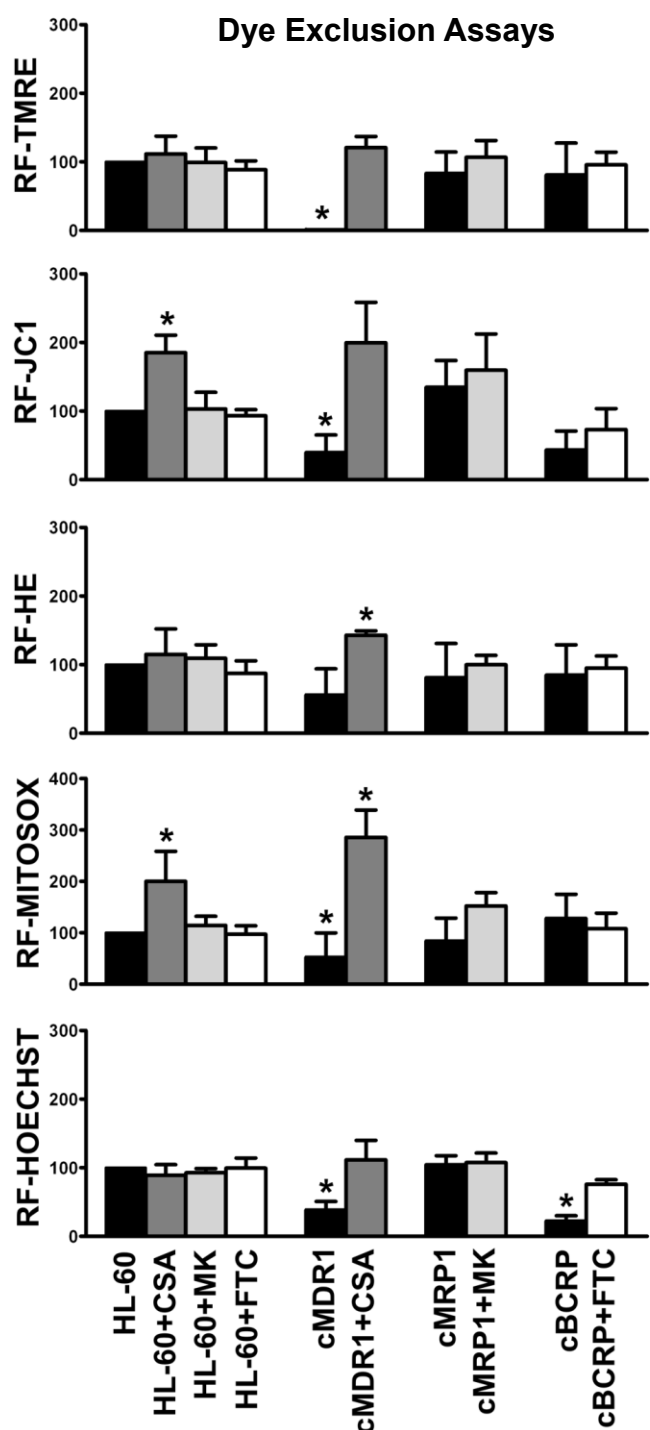
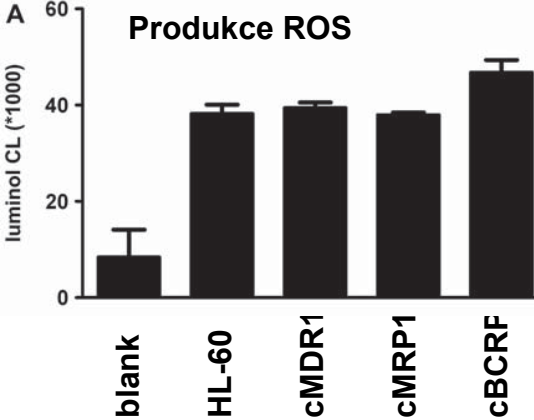
HL-60 buňky s vysokou expresí jednotlivých ABC



WB



Nádorové buňky



Většina barviv používaných na detekci ROS jsou substráty ABC transportérů

■ no inhibitor ■ MK
 ■ CSA ■ FTC

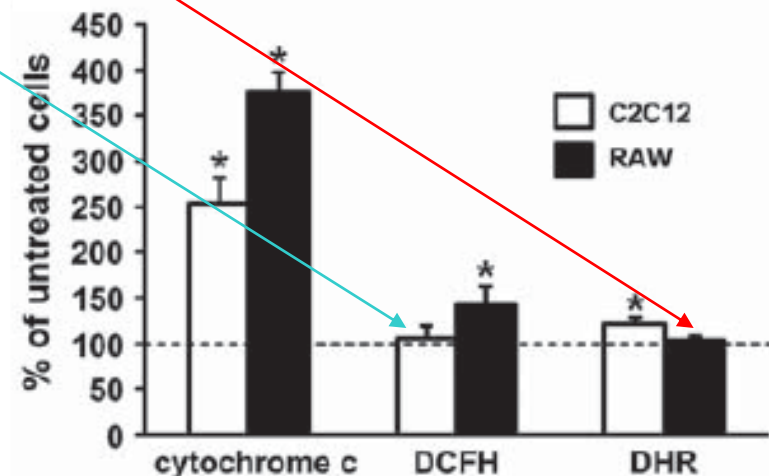
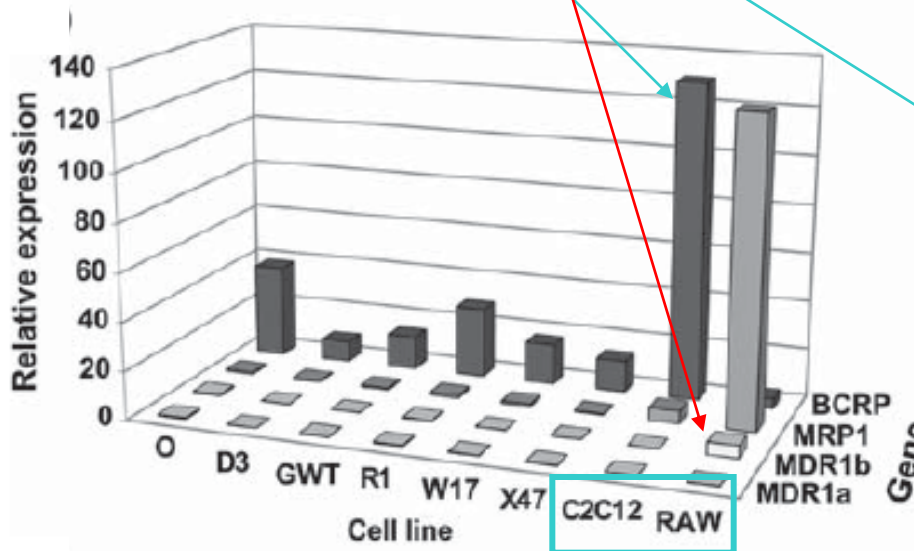
ABC transportéry ovlivňují výsledky klasických metod

Table I. Summary of ABC transporters' ability to efflux studied probes.

ABC transporter	Probe								
	DCFH	DHR	DIOC6	HE	JC1	MitoSOX	TMRE	Calcein	Hoechst
MDR1	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++
MRP1	+	-	-	+	-	+	+	+++	-
BCRP	+++	+	-	+	+	+	-	-	+++

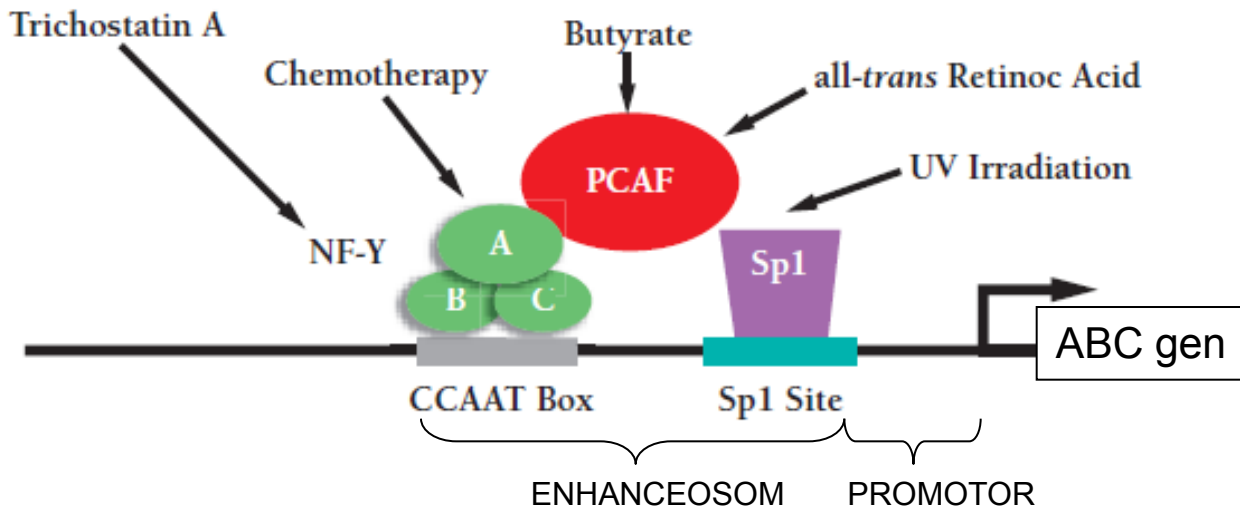
+++ , very strong substrate; + , weak substrate; - , no substrate.

Falešně negativní
výsledek je způsoben
nevhodnou kombinací
barviva a linie



PMA indukuje produkci ROS

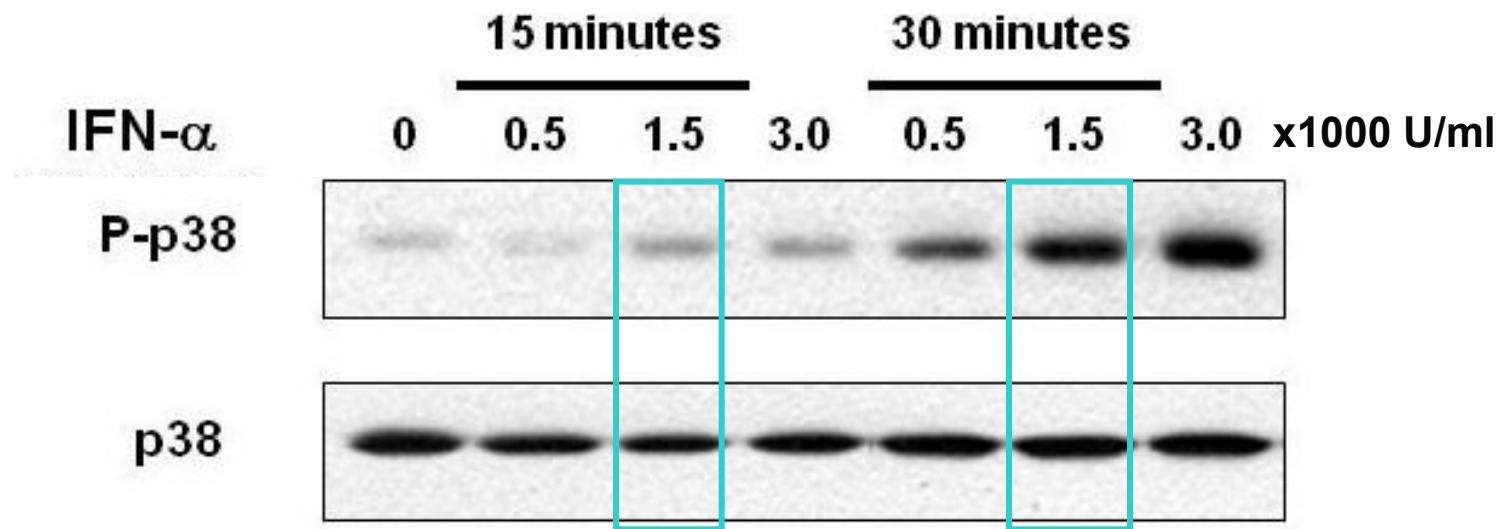
Regulace transkripce



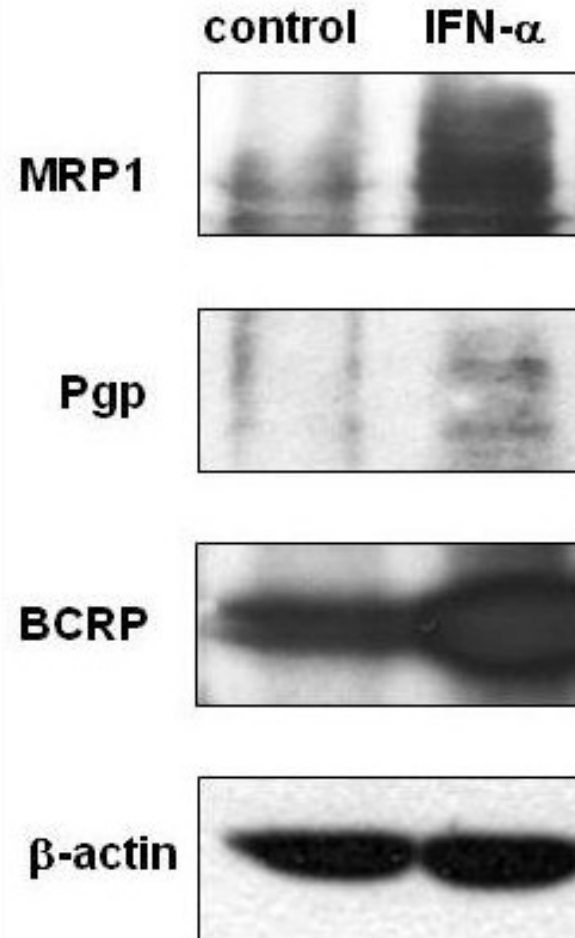
- Stres (teplo, zánět, hypoxie, UV záření, diferenciační činidla) vedou k zvýšení transkripce ABC transportérů
Studium promotoru + enhanceosomu

- Rychlé zvýšení exprese po inkubaci s jejich substráty (doxorubicin, vinca alkaloidy, etoposid, taxely)
Jak zamezit zvýšení exprese dřív než nastane???

**Studium signálních drah vedoucích
k zvýšené expresi ABC transportérů – p38 MAPK**



IFN α induces fosforylation of p38 kinase

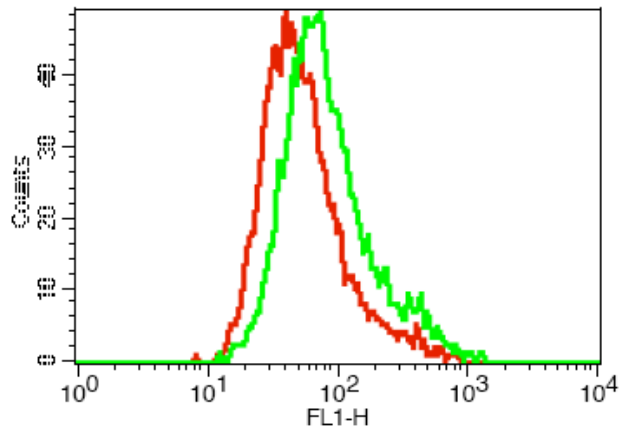


IFN α increases expression of ABC transporters

„Dye exclusion assays“

JC1(MDR1)

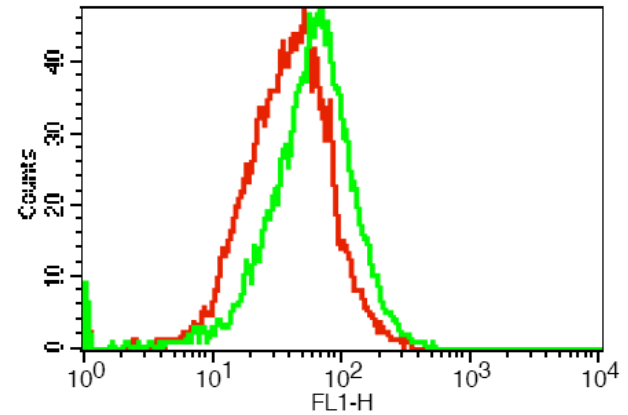
median 45.3 67.9



— p38+/+
— p38-/-

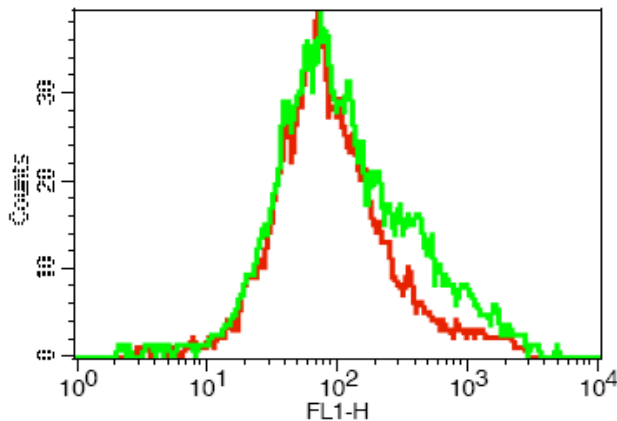
Calcein AM (MRP1)

median 37.5 57.2



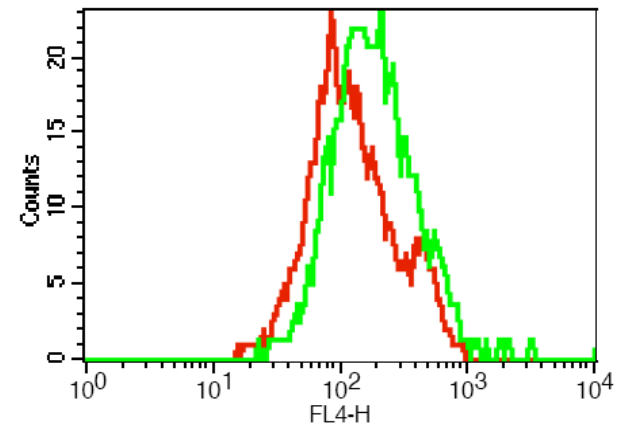
Bodipy-prazosin (BCRP)

median 74.3 90.5

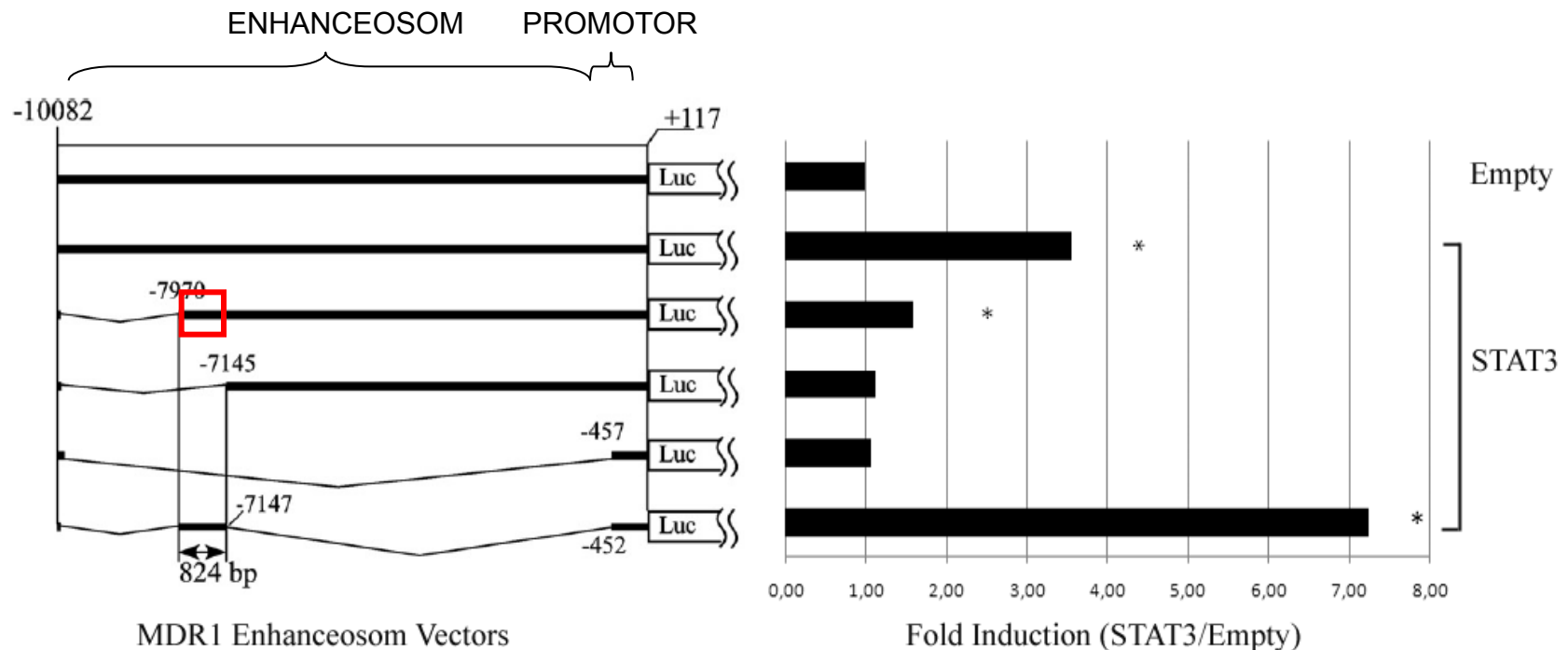


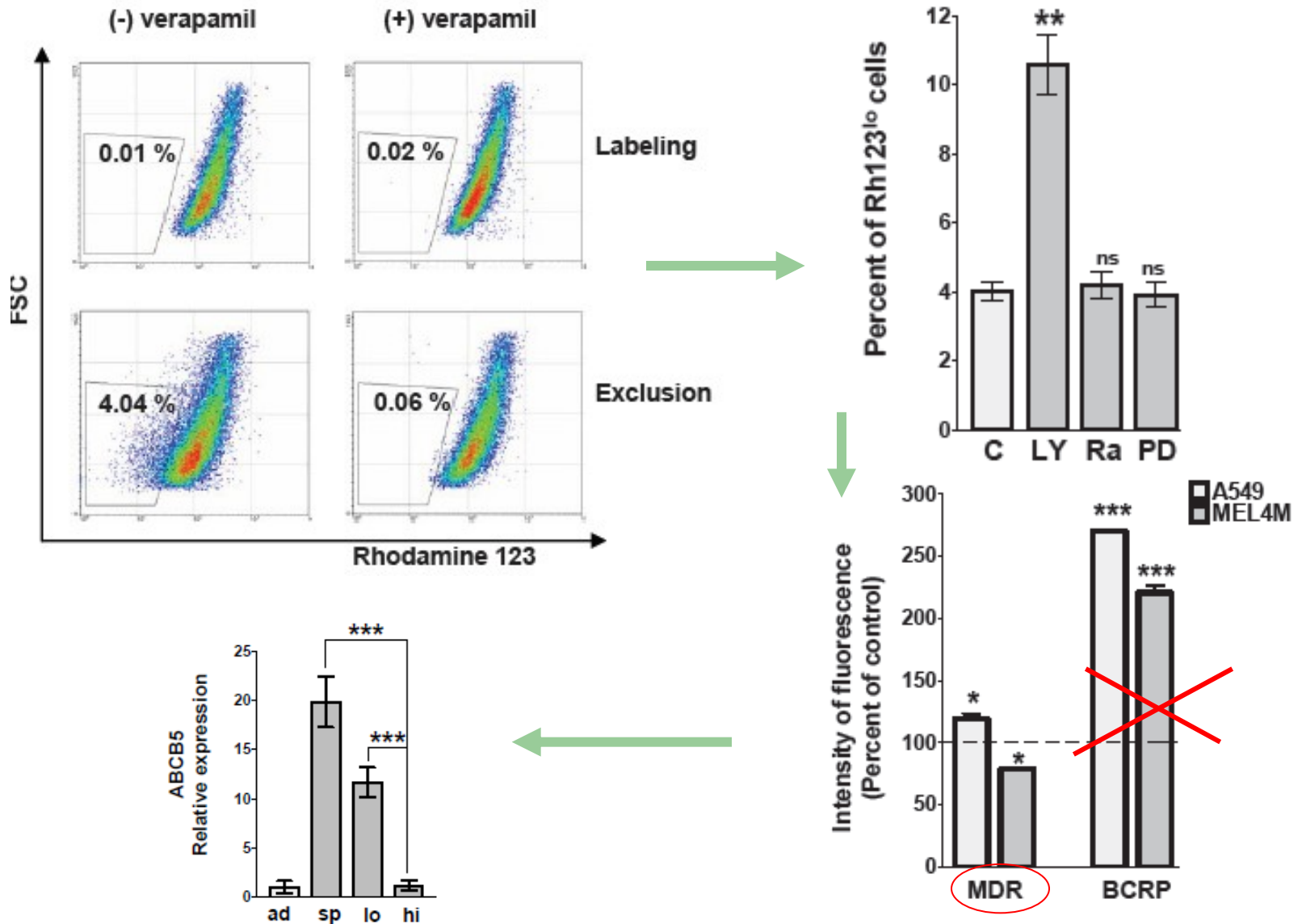
Pheophorbid A

median 107.1 164.5

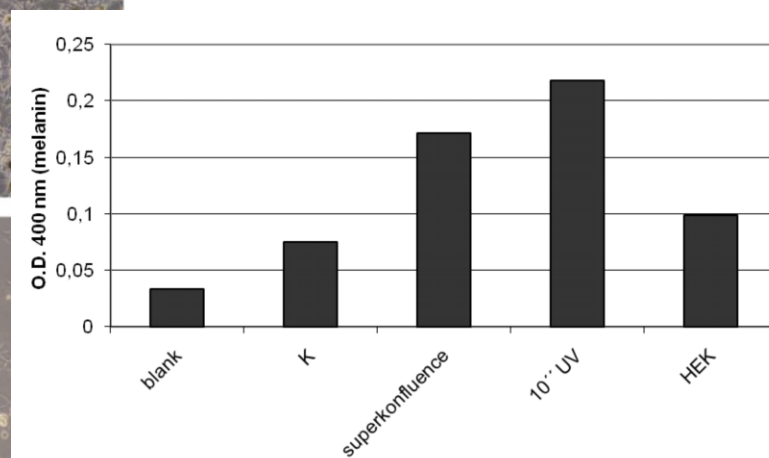
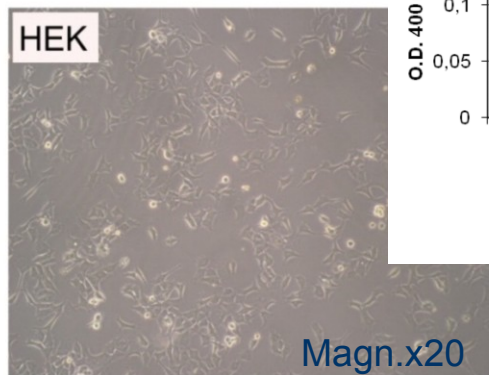
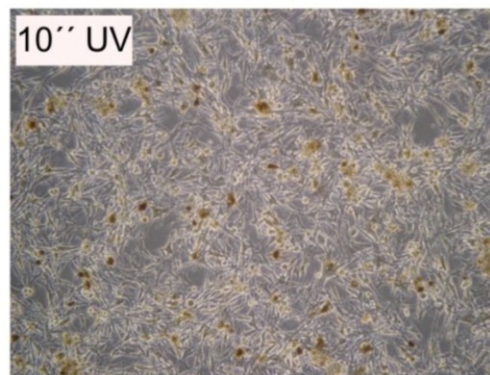
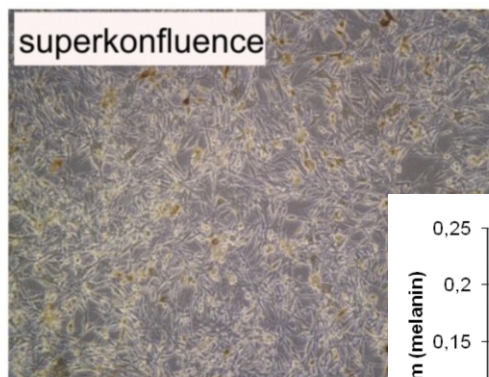
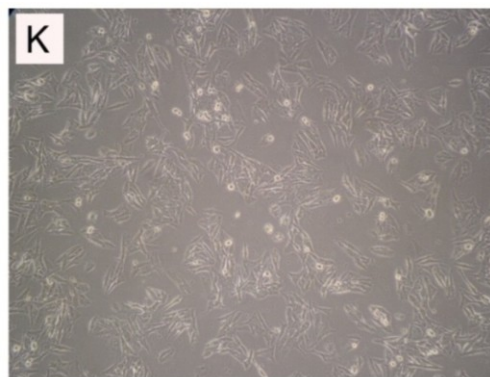


- Zvýšená exprese MDR1 je doprovázena aktivací STAT3
- Inhibice STAT3 vedla ke snížení rezistence nádorových buněk k chemoterapeutikám
- Ko-transfekce STAT3 a sady reportérů pro MDR1





Produkce melaninu



Role ABC B5 v melanogenezi

- ABC transportéry přenášejí látky aktivně VEN z buňky
- Důležité pro obranu organismu
- Jejich nadměrná exprese v rakovinných buňkách vede k multilékové rezistenci
- Substrátem ABC transportérů jsou i fluorescenční próby pro stanovení ROS, mitochondriální funkce

- Analýza vazebného místa STAT3 v MDR1 enhanceosomu
- Rezistence melanomů způsobená MDR5
- Vliv základních kinázových kaskád na transkripci ABC transportérů v nádorových a ES buňkách
- Role ABC transportérů v buněčném cyklu
- Biokompatibilita materiálů s povrchy upravenými plazmou

Děkuji za pozornost

ABC transporters' by Vicky Summersby, inspired by the Review on p218



jipro@sci.muni.cz